

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



<b>(51) 国際特許分類6</b> <b>C12N 15/12, A61K 31/70, C12N 5/10,</b> <b>C07K 14/82, 16/32</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO97/46676</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 1997年12月11日(11.12.97)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP97/01893  <b>(22) 国際出願日</b> 1997年6月4日(04.06.97)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平8/168429                      1996年6月7日(07.06.96)      JP 特願平8/287572                      1996年10月8日(08.10.96)      JP 特願平8/330424                      1996年11月25日(25.11.96)      JP  <b>(71) 出願人；および</b> <b>(72) 発明者</b> 伊東恭悟(ITHO, Kyogo)[JP/JP] 〒841-02 佐賀県三養基郡基山町けやき台2-25-9 Saga, (JP) <b>(72) 発明者；および</b> <b>(75) 発明者／出願人（米国についてののみ）</b> 七條茂樹(SHICHIJO, Shigeki)[JP/JP] 〒830 福岡県久留米市東櫛原町47-3-608 Fukuoka, (JP) 今井康久(IMAI, Yasuhisa)[JP/JP] 〒830 福岡県久留米市南蕨西町2000-1-105 Fukuoka, (JP) <b>(74) 代理人</b> 弁理士 青山 傑, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)	<b>(81) 指定国</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ARIPO特許 (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG),  添付公開書類 国際調査報告書	
<b>(54) Title: TUMOR ANTIGEN PROTEINS, GENES THEREOF, AND TUMOR ANTIGEN PEPTIDES</b>  <b>(54) 発明の名称</b> 腫瘍抗原タンパク質、その遺伝子および腫瘍抗原ペプチド  <b>(57) Abstract</b> DNAs encoding a protein having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 or its modifications having the same amino acid sequence except for one or more amino acids having been substituted, deleted or added, provided that this protein and its modifications can form, through intracellular digestion, peptide fragments capable of binding to major histo-compatibility complex (MHC) class I antigens and being recognized by T cells in the bonded state; drugs containing these DNAs as the active ingredient; expression plasmids having these DNAs; transformants transformed by these expression plasmids; and tumor antigen proteins and tumor antigen peptides produced by expressing these DNAs.		

(57) 要約

配列番号：1のアミノ酸配列を有するタンパク質、又はそのアミノ酸配列のうち1もしくは複数のアミノ酸残基が置換、欠失もしくは付加された変異タンパク質、をコードするDNA（ただし、該タンパク質および変異タンパク質はその細胞内分解により、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスI抗原と結合し得るペプチド断片であってその結合状態でT細胞により認識され得るペプチド断片、を生じ得るものである）、該DNAを有効成分として含有する医薬、該DNAを有する発現プラスミド、該発現プラスミドによって形質転換された形質転換体、前記DNAを発現して生産される腫瘍抗原タンパク質及び腫瘍抗原ペプチド。

参考情報

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	ES	スペイン	LR	リベリア	SG	シンガポール
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LS	レソト	SI	スロヴェニア
AT	オーストリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BA	ボスニア・エルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャード
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MK	マケドニア共和国	TJ	タジキスタン
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ		ラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	ML	マリ	TR	トルコ
BR	ブラジル	ID	インドネシア	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MR	モリタニア	UA	ウクライナ
CA	カナダ	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MX	メキシコ	US	米国
CG	コンゴ	IT	イタリア	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CH	スイス	JP	日本	NL	オランダ	VN	ヴィエトナム
CJ	コート・ジボアール	KE	ケニア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CN	中国	KR	朝鮮民主主義人民共和国	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ共和国	LC	セントルシア	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	RU	ロシア連邦		
DK	デンマーク	LK	スリランカ	SD	スーダン		
EE	エストニア			SE	スウェーデン		

## 明 細 書

## 腫瘍抗原タンパク質、その遺伝子および腫瘍抗原ペプチド

## 発明の属する技術分野

本発明は抗腫瘍免疫を活性化するための医薬、自己免疫疾患を治療するための医薬、および腫瘍または自己免疫疾患の診断に関する。さらに詳しくは、本発明は、新規な腫瘍抗原タンパク質、その新規な遺伝子、新規な腫瘍抗原ペプチドなどに関する。

## 従来の技術

生体による腫瘍の排除には免疫系、特にT細胞が重要な役割を果たしていることが知られている。実際、ヒトの腫瘍局所には腫瘍細胞に対して傷害活性を示すリンパ球の浸潤が認められ(Arch. Surg., 126:200-205, 1990)、メラノーマからは自己の腫瘍細胞を認識する細胞傷害性T細胞(CTL)が比較的容易に分離されている(Immunol. Today, 8:385, 1987、J. Immunol., 138:989, 1987、Int. J. Cancer, 52:52-59, 1992等)。また、T細胞移入によるメラノーマ治療の臨床結果も腫瘍排除におけるT細胞の重要性を示唆している(J. Natl. Cancer. Inst., 86:1159, 1994)。

自己の腫瘍細胞を攻撃するCTLが標的とする分子については長い間不明であったが、最近の免疫学および分子生物学の進歩により次第に明らかになってきた。すなわち、CTLは、T細胞受容体(TCR)を用いて、腫瘍抗原ペプチドが主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスI抗原に結合した複合体を認識して自己の腫瘍細胞を攻撃していることが明らかとなった。

この腫瘍抗原ペプチドは、腫瘍抗原タンパク質が細胞内で合成された後、

プロテオソームによって細胞質内でペプチドに分解されることによって生成される。一方、小胞体で形成されたMHCクラスI抗原は、上記の腫瘍抗原ペプチドと結合し、シスゴルジを経て成熟側のトランスゴルジへと移動し細胞表面に発現する（臨床免疫, 27(9):1034-1042, 1995)。

この腫瘍抗原タンパク質としては、1991年に T. Boon らが初めてMAGEと名付けたタンパク質をヒトメラノーマ細胞から同定し(Science, 254:1643-1647, 1991)、またその後、いくつかの腫瘍抗原タンパク質がさらにメラノーマ細胞から同定されている。

今までに同定された腫瘍抗原タンパク質は、T. Boonらの総説(J. Exp. Med., 183, 725~729, 1996)に記述されているように、以下の4つのカテゴリーに分けることができる。

1つ目のカテゴリーに含まれる腫瘍抗原タンパク質は、正常組織では精巣でのみ発現しており、腫瘍組織ではメラノーマ、頭頸部癌、非小細胞性肺癌、膀胱癌などに発現が認められる一群のタンパク質である。このカテゴリーの腫瘍抗原タンパク質としては、上記のMAGE、その12種類以上の類似するファミリーを形成するタンパク質群(J. Exp. Med., 178:489-495, 1993)、BAGE(Immunity, 2:167-175, 1995)およびGAGE(J. Exp. Med., 182:689-698, 1995)があり、いずれもメラノーマ細胞から同定されている。

しかし、このカテゴリーの腫瘍抗原タンパク質は、メラノーマでは高発現しているものもあるが、その他の種類の腫瘍ではその腫瘍の患者のうち10%から30%程度にしか発現しておらず、種々の腫瘍の治療や診断に広く応用することはできない。

2番目のカテゴリーに含まれる腫瘍抗原タンパク質は、正常組織ではメラノサイト、網膜でのみ発現しており、腫瘍組織ではメラノーマのみで発

現が認められる一群のタンパク質である。これらの組織特異的なタンパク質は腫瘍細胞のメラノーマに強度に発現していることから、メラノーマに特異的な腫瘍抗原タンパク質として機能している。このカテゴリーの腫瘍抗原タンパク質としては、チロシナーゼ(J. Exp. Med., 178:489-495, 1993)、MART-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:3515, 1994)、gp100 (J. Exp. Med., 179:1005-1009, 1994)、gp75 (J. Exp. Med., 181:799-804, 1995)があり、これらの遺伝子はいずれもメラノーマ細胞からクローニングされている。また、別途Melan-A (J. Exp. Med., 180:35, 1994)が同定されたが、MART-1と同一の分子であった。

しかし、このカテゴリーの腫瘍抗原タンパク質は、メラノーマ以外の腫瘍では発現していないため、広く腫瘍の治療や診断に応用することはできない。

3番目のカテゴリーに含まれる腫瘍抗原タンパク質は、腫瘍特異的な突然変異により新たにCTLに認識される腫瘍抗原ペプチドが生じるようになる一群のタンパク質である。このカテゴリーの腫瘍抗原タンパク質としては、突然変異したCDK4 (Science, 269:1281-1284, 1995)、 $\beta$ -catenin (J. Exp. Med., 183:1185-1192, 1996)、MUM-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:7976-7980, 1995)がある。CDK4、 $\beta$ -cateninでは、1つのアミノ酸変異により、ペプチドのMHCクラスI抗原結合親和性が増加し、T細胞に認識されるようになる。MUM-1では、突然変異により、通常は翻訳されないイントロン部位が翻訳されることにより生じるペプチドがT細胞に認識されている。しかし、これらの突然変異の頻度は低いため、広く腫瘍の治療や診断に応用することはできない。

4番目のカテゴリーに含まれる腫瘍抗原タンパク質は、正常組織にも広範に発現しているが、CTLに認識されるタンパク質であるP15 (J. Imm

unol, 154:5944-5955, 1995)がメラノーマ細胞から同定されている。

これまでに知られている腫瘍抗原タンパク質または腫瘍抗原ペプチドの同定方法は以下の様になされている。

まず、これらの同定に際して、腫瘍細胞およびこの細胞を攻撃するCTL（通常、腫瘍細胞と同一の患者のリンパ球から樹立する）のセットの用意を行う。つづいて、このセットの細胞を用いて腫瘍抗原ペプチドを直接同定するか、または腫瘍抗原タンパク質をコードする遺伝子を決定してさらにその対応する腫瘍抗原ペプチドを同定することによって行われる。

すなわち、腫瘍抗原ペプチドを直接同定する方法としては、腫瘍細胞のMHCクラスI抗原に結合している腫瘍抗原ペプチドを酸性条件下で抽出し、高速液体クロマトグラフィーで分離された種々のペプチドを、MHCクラスI抗原を発現しているが腫瘍抗原タンパク質を発現していない細胞（例えば、同一患者のB細胞など）にパルスし、CTLの反応を調べることにより腫瘍抗原ペプチドを同定し、さらにマスペクトロメトリーなどを用いて配列を決定する方法である。この方法によって、メラノーマ細胞からgp100と同一分子のPmel17由来の腫瘍抗原ペプチドが同定された(Science, 264:716-719, 1994)。

また、腫瘍抗原タンパク質をコードする遺伝子を決定してさらにその対応する腫瘍抗原ペプチドを同定する方法としては、分子生物学的手法を用いて腫瘍抗原タンパク質をコードする遺伝子をクローニングする方法がある。腫瘍細胞からcDNAを調製し、そのcDNAを腫瘍抗原タンパク質を発現していない細胞（例えばCOS細胞など）にMHCクラスI抗原遺伝子とともにトランスフェクトして一過的に発現させ、それに対するCTLの反応性によるスクリーニングを繰り返し行い、腫瘍抗原タンパク質をコードする遺伝子を単離する。この方法により、上記のMAGE、チロシ

ナーゼ、MART-1、gp100、gp75の遺伝子がクローニングされた。

この腫瘍抗原遺伝子の情報から実際にMHCクラスI抗原に結合して提示されている腫瘍抗原ペプチドを推定、同定するために次のような方法を用いる。まず、PCR、エキソヌクレアーゼ、制限酵素などにより様々なサイズの腫瘍抗原タンパク質をコードする遺伝子のフラグメントを作製し、MHCクラスI抗原遺伝子とともに腫瘍抗原タンパク質を発現していない細胞（例えばCOS細胞など）にトランスフェクトして一過性に発現させ、CTLの反応性により腫瘍抗原ペプチドを含む領域を限定する。その後、ペプチドを合成し、MHCクラスI抗原は発現して腫瘍抗原タンパク質を発現していない細胞にパルスし、CTLの反応を調べることなどにより腫瘍抗原ペプチドを同定する(J. Exp. Med., 176:1453, 1992、J. Exp. Med., 179:24, 759, 1994)。また、HLA-A1, -A201, -A205, -A11, -A31, -A6801, -B7, -B8, -B2705, -B37, -Cw0401, -Cw0602などのMHCの型については、結合して提示されるペプチドの配列の規則性（モチーフ）が判明しており(Immunogenetics, 41:178-228, 1995)、それを参考にして腫瘍抗原ペプチドの候補を調べ、そのペプチドを合成して上記と同様な方法で確認する方法も用いられる(Eur. J. Immunol., 24:759, 1994、J. Exp. Med., 180:347, 1994)。

また、腫瘍において高発現している腫瘍抗原タンパク質は、一方で、正常組織にも発現し、その腫瘍抗原タンパク質に由来する免疫反応が過剰に起こることで、自己免疫疾患を引き起こしているとも考えられている。例えば、化学療法剤とIL-2を併用してメラノーマの治療を行った場合、白斑症状の出現が認められるとの報告(J. Clin. Oncol., 10:1338-1343, 1992)がある。これは、メラノーマに発現する腫瘍抗原タンパク質の断片（ペ

プチド断片という)とMHCクラスI抗原の複合体に対してCTLまたは抗体が誘導、産生され、正常組織である皮膚組織に作用することで自己免疫疾患様の症状である白斑症状が出現したためと考えられる。

#### 発明が解決しようとする課題

上記の様に既知の腫瘍抗原タンパク質はいずれも、限られた腫瘍でしか発現していないか、または多くの種類の腫瘍で発現していてもその腫瘍の患者のうちの少数にしか発現していないため、種々の腫瘍の治療や診断に幅広く応用できるものではない。

そこで、本発明が解決しようとする課題は、既知の腫瘍抗原タンパク質またはその断片(以下、ペプチド断片または腫瘍抗原ペプチドという)を用いて実施できる腫瘍の治療や診断と異なって、扁平上皮癌等を含む幅広い腫瘍に応用できるもの、または応用可能な腫瘍が限られていてもその腫瘍の患者のうち多くの人に応用できるもの、またはその腫瘍の治療や診断を補完しつつ各種腫瘍に応用できるものである腫瘍抗原タンパク質またはその対応する腫瘍抗原ペプチド等を提供することにある。

なお、扁平上皮癌は、ヒトの癌で最も多く認められる癌のひとつである。特に、食道癌や肺癌での扁平上皮癌は現在の化学療法や放射線療法に比較的高抵抗性を示すことが知られている。その点からも腫瘍抗原タンパク質またはその対応する腫瘍抗原ペプチド等を用いた特異的免疫療法の開発が期待されている。

また、腫瘍抗原タンパク質に由来する特異的免疫が過剰に惹起されたことにより自己免疫疾患が発症した場合には、腫瘍抗原タンパク質をコードする遺伝子の発現を妨ぐアンチセンスDNA・RNAや腫瘍抗原ペプチドのアンタゴニストなどを用いて、免疫反応を特異的にブロックする治療法が期待される。



#### 課題を解決するための手段

本発明者らは、各種の腫瘍、特に扁平上皮癌等の治療や診断に幅広く応用できる腫瘍抗原タンパク質またはその対応する腫瘍抗原ペプチド等を得るために、メラノーマ以外の腫瘍からの腫瘍抗原タンパク質の同定を試みた。

すなわち、本発明者らは食道癌由来の扁平上皮癌細胞株KE-4(以下、食道癌細胞株KE-4、あるいは単にKE-4と称す)を樹立し、また該KE-4において発現するMHCクラスI抗原であるHLA-A2601に拘束性の腫瘍抗原ペプチドを認識するCTL(以下、KE-4CTLと称す)を樹立した(Cancer. Res., 55:4248-4253, 1995)。

つづいて、線維芽細胞株VA-13細胞に、KE-4から作製したcDNAライブラリーの組換えプラスミドとHLA-A2601cDNAの組換えプラスミドを同時にトランスフェクトし、そのトランスフェクタントにKE-4CTLを作用させ、KE-4CTLが活性化されたかをIFN- $\gamma$ の産生量で測定しスクリーニングした。その結果、メラノーマ以外の腫瘍細胞から初めて、本発明の腫瘍抗原タンパク質をコードする新規な遺伝子をクローニングすることに成功した。

即ち、本発明の要旨は、

(1) 配列番号：1のアミノ酸配列を有するタンパク質、又はそのアミノ酸配列のうち1もしくは複数のアミノ酸残基が置換、欠失もしくは付加された変異タンパク質、をコードするDNA(ただし、該タンパク質および変異タンパク質はその細胞内分解により、MHCクラスI抗原と結合し得るペプチド断片であってその結合状態でT細胞により認識され得るペプチド断片、を生じ得るものである)、

(2) 配列番号：2の塩基配列からなるDNA、又はそのDNAとストリ

ンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA変異体（ただし、該DNAおよびDNA変異体が発現して生産されるタンパク質は、その細胞内分解により、MHCクラスI抗原と結合し得るペプチド断片であってその結合状態でT細胞により認識され得るペプチド断片、を生じ得るものである）、

（3）前記（1）または（2）記載のDNAを有効成分として含有する医薬、

（4）前記（1）または（2）記載のDNAを有する発現プラスミド、

（5）前記（4）記載の発現プラスミドによって形質転換された形質転換体、

（6）前記（1）または（2）記載のDNAを発現して生産される腫瘍抗原タンパク質、

（7）前記（6）記載のタンパク質の一部からなるペプチドであって、MHCクラスI抗原と結合してT細胞により認識され得る腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体、

（8）配列番号：1のアミノ酸配列の第749位～第757位、第736位～第744位、第785位～第793位、又は第690位～第698位のアミノ酸配列の全部又は一部を有するペプチドである、前記（7）記載の腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体、

（9）前記（6）記載の腫瘍抗原タンパク質、前記（7）または（8）記載の腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体を有効成分として含有する医薬、

（10）前記（6）記載の腫瘍抗原タンパク質、または前記（7）もしくは（8）記載の腫瘍抗原ペプチドに特異的に結合する抗体、

（11）配列番号：2の塩基配列からなるDNAのコーディング配列または5' ノンコーディング配列の中のDNA断片と相補的な配列をもつ8塩

基以上からなるDNA若しくはそのDNAに対応するRNA、またはそれらの化学的修飾体、に関する。

#### 発明の実施の形態

本発明のDNAは、新規な腫瘍抗原タンパク質をコードするものであり、配列番号：1のアミノ酸配列を有するタンパク質、又はそのアミノ酸配列のうち1もしくは複数のアミノ酸残基が置換、欠失もしくは付加された変異タンパク質、をコードするDNA（ただし、該タンパク質および変異タンパク質はその細胞内分解により、MHCクラスI抗原と結合し得るペプチド断片であってその結合状態でT細胞により認識され得るペプチド断片、を生じ得るものである）、あるいは、配列番号：2の塩基配列からなるDNA、又はそのDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA変異体（ただし、該DNAおよびDNA変異体が発現して生産されるタンパク質は、その細胞内分解により、MHCクラスI抗原と結合し得るペプチド断片であってその結合状態でT細胞により認識され得るペプチド断片、を生じ得るものである）が例示される。

本明細書において、「アミノ酸配列のうち1もしくは複数のアミノ酸残基が置換、欠失もしくは付加された変異タンパク質」とは、人為的に作製したいわゆる改変タンパク質や、タンパク質をコードするDNAに一般にみられる多形、変異や修飾反応などにより得られる機能的に同等の特性を有するタンパク質を意味し、この変異タンパク質をコードするDNAは、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual第2版第1-3巻 Sambrook, J.ら著, Cold Spring Harbor Laboratory Press出版 New York 1989年に記載の方法、例えば部位特異的変異誘発やPCR法等によって製造することができる。なお、ここで置換、欠失もしくは付加されるアミノ酸残基の数は、上記部位特異的変異誘発等の周知の方法により置換、欠失も

しくは付加できる程度の数を指す。

本明細書において、「DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA変異体」とは、例えば前述のMolecular Cloning に記載の方法によって得ることができる。ここで、「ストリンジェントな条件」とは、例えば、 $6\times\text{SSC}$  ( $20\times\text{SSC}$ は、 $333\text{mM Sodium citrate}$ 、 $333\text{mM NaCl}$ を示す)、 $0.5\%$  SDSおよび $50\%$ ホルムアミドを含む溶液中で $42^{\circ}\text{C}$ にてハイブリダイズさせた後、 $0.1\times\text{SSC}$ 、 $0.5\%$  SDSの溶液中で $68^{\circ}\text{C}$ にて洗浄するような条件、あるいは、中山ら著、バイオ実験イラストレイテッド②遺伝子解析の基礎、p. 148-151、秀潤社、1995年、に記載の条件等を指す。本明細書においては、このようなハイブリダイズするDNAが発現して生産されるタンパク質は、そのタンパク質を構成する一部のペプチド断片がMHCクラスI抗原と結合してT細胞により認識されるペプチド部分を含むものである。

本明細書において、「細胞内分解により、MHCクラスI抗原と結合し得るペプチド断片であってその結合状態でT細胞により認識され得るペプチド断片を生じ得るタンパク質および変異タンパク質」（以下、これらのタンパク質を腫瘍抗原タンパク質と言う場合がある。）とは、そのタンパク質又は変異タンパク質の一部のアミノ酸配列からなる部分ペプチドがMHCクラスI抗原と結合可能であり、MHCクラスI抗原と結合して細胞表面に提示された場合、そのペプチド断片とMHCクラスI抗原の複合体に対し、特異的に結合可能なT細胞が結合してT細胞にシグナルを伝えることができる、そのようなペプチド部分を含むタンパク質又は変異タンパク質を意味する。なお、ここでいう結合とは非共有結合を意味する。

ペプチド断片がMHCクラスI抗原に結合してT細胞に認識されること

を確かめる方法としては、例えば、ペプチド断片を適当な細胞に内因性に発現させるか、または外部から加える（パルスする）ことによりMHCクラスI抗原に結合させることで細胞表面にペプチド断片を提示させ、つづいて、そのペプチド提示細胞に対して腫瘍抗原タンパク質特異的なT細胞を作用させ、そのT細胞が産出するサイトカインを測定する方法などがある。また、ペプチド提示細胞に対するT細胞の傷害活性を測定する方法として、 $^{51}\text{Cr}$ で標識したペプチド提示細胞を用いる方法（Int. J. Cancer, 58:317(1994)）も使用できる。ここで、認識するT細胞としては、CTLを用いるのが好ましい。

本発明のDNAは医薬の有効成分として使用することができる。即ち、本発明のDNAを有効成分として含有する「医薬」は、例えば、本発明のDNAを腫瘍患者等に投与することで腫瘍を治療または予防することができる。本発明のDNAを投与すると細胞内で腫瘍抗原タンパク質が高発現し、腫瘍抗原ペプチドがMHCクラスI抗原と結合して、細胞表面に高密度に提示されることにより、腫瘍特異的CTLが体内で効率的に増殖することになり、これにより腫瘍の治療または予防が達成される。本発明のDNAを投与し細胞内に導入する方法としては、ウイルスベクターによる方法およびその他の方法（日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1)、23-48(1994)、実験医学増刊、12(15)、(1994)、およびこれらの引用文献等）のいずれの方法も適用することができる。

ウイルスベクターによる方法としては、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス等のDNAウイルス又はRNAウイルスに本発明のDNAを組み込んで導入する方法が挙げられる。この中で、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイル

ス、ワクシニアウイルス等を用いた方法が特に好ましい。

その他の方法としては、発現プラスミドを直接筋肉内に投与する方法（DNAワクチン法）、リボソーム法、リポフェクチン法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられ、特にDNAワクチン法、リボソーム法が好ましい。

本発明のDNAを実際に医薬として作用させるには、DNAを直接体内に導入する *in vivo*法、およびヒトからある種の細胞を採集し体外でDNAを該細胞に導入しその細胞を体内に戻す *ex vivo*法がある（日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1)、23-48(1994)、実験医学増刊、12(15)、(1994)、およびこれらの引用文献等）。*in vivo*法がより好ましい。

*in vivo*法により投与する場合は、治療目的の疾患、症状等に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、静脈、動脈、皮下、皮内、筋肉内等に投与することができる。*in vivo*法により投与する場合は、例えば、液剤等の製剤形態をとりうるが、一般的には有効成分である本発明のDNAを含有する注射剤等とされ、必要に応じて、慣用の担体を加えてもよい。また、本発明のDNAを含有するリボソームまたは膜融合リボソーム（センダイウイルス（HVJ）-リボソーム等）においては、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリボソーム製剤の形態とすることができる。

製剤中の本発明のDNAの含量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常、0.0001mg～100mg、好ましくは0.001mg～10mgの本発明のDNAを、数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

また、本発明のDNAを用いる組換えDNA技術により、腫瘍抗原タン

パク質を大量に製造することが可能である。

本発明のDNAを発現して腫瘍抗原タンパク質を生産するには、例えば、前述のMolecular Cloning等の多くの成書や文献に基づいて実施することができる。発現させたいDNAの上流に、転写を制御するプロモーター配列（例えば、trp、lac、T7、SV40初期プロモーター）等の制御遺伝子を付加し、適当なベクター（例えばpSV-SPORT1など）に組み込むことにより、宿主細胞内で複製し、機能する発現プラスミドを作製する。次に発現プラスミドを適当な宿主細胞に導入して形質転換体を得る。宿主細胞としては、大腸菌などの原核生物、酵母のような単細胞真核生物、昆虫、動物などの多細胞真核生物の細胞などが挙げられる。また、宿主細胞への遺伝子導入法としては、リン酸カルシウム法、DEAEーデキストラン法、電気パルス法などがある。形質転換体は、適当な培地で培養することによって目的とするタンパク質を生産する。以上のようにして得られた腫瘍抗原タンパク質は一般的な生化学的方法によって単離精製することができる。

本明細書において、本発明の腫瘍抗原タンパク質の細胞内分解により生じ得る、「MHCクラスI抗原と結合し得るペプチド断片であってその結合状態でT細胞により認識され得るペプチド断片」、即ち「腫瘍抗原ペプチド」は、例えば以下の様にして決定することができる。

まず、PCR、エキソヌクレアーゼ、制限酵素などにより様々なサイズの腫瘍抗原タンパク質をコードするDNAの断片を作製後、前述のように発現ベクターに挿入し、腫瘍抗原を提示するMHCクラスI抗原をコードする遺伝子を含むプラスミドとともに腫瘍抗原タンパク質を発現していない細胞（例えばCOS細胞など）にトランスフェクトして一過性に発現させ、CTLの反応性により腫瘍抗原ペプチドを含む領域を限定する。その

後、その領域内の種々のペプチドを合成し、腫瘍抗原を提示するMHCクラスI抗原は発現するが腫瘍抗原タンパク質を発現していない細胞にパルスし、CTLの反応を調べることなどにより腫瘍抗原ペプチドを同定する(J. Exp. Med., 176:1453, 1992, J. Exp. Med., 179(24)759, 1994)。

また、HLA-A1, -A0201, -A0205, -A11, -A24, -A31, -A6801, -B7, -B8, -B2705, -B37, -Cw0401, -Cw0602などのMHCの型については、結合して提示される抗原ペプチドの配列の規則性(モチーフ)が判明しており、それを参考にして腫瘍抗原タンパク質をコードするDNAから腫瘍抗原ペプチドの候補を調べ、そのペプチドを合成して上記と同様な方法で確認する方法も用いられる(Eur. J. Immunol., 24:759, 1994, J. Exp. Med., 180:347, 1994)。

ところで、MHCにはクラスI抗原以外にクラスII抗原も存在すること、および腫瘍抗原タンパク質がマクロファージなどの抗原提示細胞に取り込まれ分解されることにより生じ得る特定の腫瘍抗原ペプチドと該MHCクラスII抗原との結合体は、腫瘍特異的なヘルパーT細胞を活性化することが知られている(J. Immunol., 146:1708-1714, 1991)。

本発明の新規な腫瘍抗原タンパク質遺伝子のクローニングの成功に伴い、上記の如きMHCクラスII抗原と結合する腫瘍抗原ペプチドについても決定することが可能である。具体的には、MHCクラスI抗原の場合と同様に、T細胞との反応性に基づく抗原ペプチドの決定法、あるいは抗原ペプチドのモチーフに関する公知の知見等に基づき、決定することが可能である。

この様にして決定される腫瘍抗原ペプチドは、通常のペプチド化学において知られている方法で製造することができる。例えば、"Peptide Synthesis", Interscience, New York, 1966, "The Proteins", Vol. 2, Academ



ic Press Inc., New York, 1976、「ペプチド合成」丸善(株), 1975、「ペプチド合成の基礎と実験」丸善(株), 1985等に記載されている方法等が挙げられる。すなわち、C末端部位の構造により液相法、固相法のいずれかを選択して合成することができ、なかでも液相法がより好ましい。すなわち、アミノ酸の官能基を適当な保護基で適宜保護および脱保護を行い、アミノ酸を一残基または数残基ずつ結合させることでペプチドを製造することができる。なお、アミノ酸の官能基の保護基については、例えば前述のペプチド化学について記載する書籍等に記載されている。

本明細書に於いて、腫瘍抗原ペプチドとは、配列番号：1で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質、又は既に定義したその変異タンパク質のいずれかから得られるペプチド断片として定義し得る。以下、配列番号：1のアミノ酸配列で示されるタンパク質由来の腫瘍抗原ペプチドおよびその誘導体についてより具体的に説明するが、その説明は変異タンパク質由来の腫瘍抗原ペプチドにも適用し得るものであることは理解されよう。

配列番号：1で示されるタンパク質の細胞内分解によって得られる腫瘍抗原ペプチドとしては、特に限定されるものではないが、例えば配列番号：1のアミノ酸配列の第749位～第757位、第736位～第744位、第785位～第793位、第690位～698位のアミノ酸配列の全部又は一部を有する腫瘍抗原ペプチドが挙げられる。好ましくは、9個のアミノ酸残基からなるものであり、例えば、配列番号：1の第749位～第757位、第736位～第744位、第785位～第793位、第690位～698位のアミノ酸配列からなるペプチドが特に好ましい。なお、本明細書において、腫瘍抗原ペプチドを表示するに際して、例えば、配列番号：1の第749位～第757位のアミノ酸配列からなるペプチドを、単に「749～757」のように略す場合がある。

本明細書において、「腫瘍抗原ペプチドの誘導体」とは、前記の腫瘍抗原ペプチドと機能的に同等の特性を有するものであって、該ペプチドの中の一部のアミノ酸残基を置換、欠失もしくは付加した誘導体、および該ペプチドまたは該ペプチドの一部のアミノ酸残基を置換、欠失もしくは付加した誘導体のアミノ基もしくはカルボキシル基を修飾した誘導体を意味する。具体的には、配列番号：1のアミノ酸配列の第749位～第757位、第736位～第744位、第785位～第793位、又は第690位～第698位のアミノ酸配列の全部又は一部を有する本発明の腫瘍抗原ペプチドにおいて、第749位～第757位、第736位～第744位、第785位～第793位、又は第690位～第698位のアミノ酸配列の中の一部のアミノ酸残基を置換、欠失したり、他のアミノ酸残基を付加した誘導体が例示される。

該ペプチドの中の一部のアミノ酸残基を置換、欠失もしくは付加した誘導体としては、好ましくは、腫瘍抗原ペプチドのうちでCTLとの結合に関与するエピトープ領域はそのままであってMHCクラスI抗原との結合に関与するアミノ酸残基が置換、欠失もしくは付加された誘導体が挙げられ、さらに好ましくはその誘導体であって一つのアミノ酸残基のみを置換したものが挙げられる(Immunol. 84:298-303, 1995)。メラノーマの腫瘍抗原タンパク質であるgp100の抗原ペプチドにおいては、MHCクラスI抗原との結合部位のアミノ酸を置換することにより、MHCクラスI抗原へより強く結合するようになり、かつ、メラノーマ患者の末梢血リンパ球をin vitroで刺激した場合、抗原ペプチドに特異的なCTLがより強く誘導されることが報告されている(J. Immunol., 157:2539-2548, 1996)。

かかる誘導体は、市販のペプチド合成機により容易に合成可能であり、合成された誘導体のMHCクラスI抗原との結合親和性は、該誘導体とラ

ジオアイソトープで標識された標準ペプチドとのMHCクラスI抗原への結合の競合阻害アッセイにより、無細胞系で容易に測定することができる(R. T. Kuboら、J. Immunol., 152:3913, 1994)。従って、作製した種々のペプチド誘導体をこのアッセイに供することにより、CTL誘導活性を有するペプチド誘導体を容易に選ぶことができる。このようにして選ばれたペプチド誘導体は、CTLとの結合性はそのまま維持しつつ、MHCクラスI抗原により強く結合可能であるため、さらに有用な腫瘍抗原ペプチドとして適用ができる。

アミノ基の修飾基としては、例えばアシル基が挙げられ、具体的には炭素数1から6のアルカノイル基、フェニル基で置換された炭素数1から6のアルカノイル基、炭素数5から7のシクロアルキル基で置換されたカルボニル基、炭素数1から6のアルキルスルホニル基、フェニルスルホニル基等が挙げられる。

カルボキシル基の修飾基としては、例えばエステル基およびアミド基が挙げられ、エステル基の具体例としては、炭素数1から6のアルキルエステル基、フェニル基で置換された炭素数0から6のアルキルエステル基、炭素数5から7のシクロアルキルエステル基等が挙げられ、アミド基の具体例としては、アミド基、炭素数1から6のアルキル基1つまたは2つで置換されたアミド基、フェニル基で置換された炭素数0から6のアルキル基1つまたは2つで置換されたアミド基、アミド基の窒素原子を含んで5から7員環のアザシクロアルカンを形成するアミド基等が挙げられる。

本明細書において、「抗体」は、例えば、Antibodies; A Laboratory Manual, Lane, H. D.ら編, Cold Spring Harbor Laboratory Press出版 New York 1989年などに記載の方法により容易に作製される。即ち、腫瘍抗原タンパク質または腫瘍抗原ペプチドを用いて常法により適宜動物を免疫

することにより、腫瘍抗原タンパク質、腫瘍抗原ペプチドを認識する抗体、さらにはその活性を中和する抗体が容易に作製できる。抗体の用途としては、アフィニティークロマトグラフィー、cDNAライブラリーのスクリーニング、免疫学的診断法、医薬等が挙げられる。免疫学的診断法は、イムノブロット法、放射免疫測定法（RIA）、酵素免疫測定法（ELISA）、蛍光あるいは発光測定法等より適宜選択できる。

本明細書において、「配列番号：2の塩基配列からなるDNAのコーディング配列または5'ノンコーディング配列の中の断片DNAと相補的な配列をもつ8塩基以上からなるDNA若しくはそのDNAに対応するRNA」とは、2本鎖DNAのアンチセンス鎖のDNAまたはそのアンチセンス鎖のDNAに対応するRNAであって8塩基以上のもの（以下、アンチセンスオリゴヌクレオチドという。）をいう。

このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば本発明の腫瘍抗原タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列を基にしてDNAとして製造するか、またはこのDNAをアンチセンスの向きに発現プラスミドに組み込むことでRNAとして製造することができる。

このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、本発明の遺伝子である配列番号：2の塩基配列からなるDNAのコーディング配列、5'ノンコーディング配列のいずれの部分のDNA断片と相補的な配列であってもよいが、好ましくは転写開始部位、翻訳開始部位、5'非翻訳領域、エクソンとイントロンとの境界領域もしくは5'CAP領域に相補的配列であることが望ましい。

上記「DNA若しくはそのDNAに対応するRNA」の「化学的修飾体」（以下、アンチセンスオリゴヌクレオチドの化学的修飾体という）としては、DNAまたはRNAの細胞内への移行性または細胞内での安定性を高

めることができる化学的修飾体を表し、例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、アルキルホスホトリエステル、アルキルホスホナート、アルキルホスホアミデート等の誘導体 ("Antisense RNA and DNA" WILEY-LISS刊 1992 P. 1-50)が挙げられる。この化学的修飾体は、同文献等に従って製造することができる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその化学的修飾体を用いて、腫瘍抗原タンパク質をコードする遺伝子の発現を制御することができる。腫瘍抗原タンパク質の過剰発現が自己免疫疾患の原因である場合は、この方法によって腫瘍抗原タンパク質の生産量を減らすことで、CTLによる傷害を軽減するとともにCTLの増殖を抑制することとなり自己免疫疾患を治療または予防することができる。

アンチセンスオリゴヌクレオチド又はその化学的修飾体をそのまま投与する場合は、このアンチセンスオリゴヌクレオチドの好ましい長さとしては、例えば8～200塩基のものが挙げられ、さらに好ましくは10～25塩基が挙げられ、特に好ましくは12～25塩基のものが挙げられる。

また、アンチセンスオリゴヌクレオチドを発現プラスミドに組み込む場合は、このアンチセンスオリゴヌクレオチドの好ましい長さとしては、例えば100塩基以上が挙げられ、好ましくは300～1000塩基が挙げられ、さらに好ましくは500～1000塩基が挙げられる。

アンチセンスオリゴヌクレオチドを発現プラスミドに組み込んだ後細胞に導入する方法としては、例えば実験医学、12巻、1994年に述べられている方法が挙げられ、リポソームや組換えウイルスなどを利用した方法が挙げられる。アンチセンスオリゴヌクレオチドの発現プラスミドは通常の発現ベクターを用いてプロモーターの後ろに逆向きに、すなわち本発明の遺伝子が3'から5'の向きに転写されるように、本発明の遺伝子をつなぐ

だけで簡単に作製できる。

アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドの化学的修飾体をそのまま投与する場合、安定化剤、緩衝液、溶媒などと混合して製剤した後、抗生物質、抗炎症剤、麻酔薬などと同時に投与してもよい。こうして作成された製剤は様々な方法で投与可能である。投与は連日または数日から数週間おきになされるのが好ましい。また、このような頻回の投与を避けるために徐放性のミニベレット製剤を作成し患部近くに埋め込むことも可能である。あるいはオスモチックポンプなどを用いて患部に連続的に徐々に投与することも可能である。通常投与量は作用部位における濃度が0.1nM-10 $\mu$ Mになるように調製する。

本発明の腫瘍抗原タンパク質および腫瘍抗原ペプチド並びに機能的に同等の特性を有するそれらの誘導体は、単独又は2種以上を組み合わせる用いることができ、それらを有効成分として含有する医薬は、細胞性免疫が効果的に成立するようにアジュバントとともに投与したり、粒子状の剤型にして投与することができる。即ち、腫瘍抗原タンパク質や腫瘍抗原ペプチドを生体に投与すると、抗原提示細胞のMHCクラスI抗原に腫瘍抗原ペプチドが高密度に提示され、腫瘍特異的CTLが効率よく増殖する。アジュバントとしては、文献 (Clin. Microbiol. Rev., 7:277-289, 1994)に記載のものなどが応用可能である。また、剤型としては、リボソーム製剤、直径数 $\mu$ mのビーズに結合させた粒子状の製剤、リピッドを結合させた製剤など外因性の抗原ペプチドをMHCクラスI抗原へ効率良く抗原提示させる投与法が用いられる。また、腫瘍抗原ペプチドをパルスした樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞や腫瘍抗原タンパク質をコードするDNAを導入した細胞を投与する方法も考えられる。製剤中の本発明の腫瘍抗原タンパク質および腫瘍抗原ペプチドの投与量は、治療目的の疾患、

患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常0.0001mg～1000mg、好ましくは0.001mg～1000mgであり、これを数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

本発明の腫瘍抗原ペプチドを用いる *in vitro* での末梢血リンパ球からのCTLの誘導方法が、下記のように例示される。

前記扁平上皮癌を有する食道癌患者由来の末梢血リンパ球を *in vitro* で培養し、培養液に本発明の腫瘍抗原ペプチドとして、例えば、「736～744」、「749～757」、「785～793」、「690～698」の配列を有するペプチドを10  $\mu$ g/mlになるように加え、末梢血リンパ球を刺激する。1週間の間隔をおいて3回の刺激を繰り返す。3回目の刺激から1週間後、末梢血リンパ球を回収し、D. D. Kharkevitch 著、Int. J. Cancer, 58: 317(1994)に記載の方法に従って、細胞傷害活性を測定することにより、本発明の腫瘍抗原ペプチドのCTLの誘導活性が見出される。

本発明の腫瘍または自己免疫疾患の診断方法としては、腫瘍抗原タンパク質または腫瘍抗原ペプチドに特異的に結合する抗体を用いて行うことができる。例えば、腫瘍組織標本から腫瘍抗原タンパク質を検出する方法、血中または組織中の腫瘍抗原タンパク質または腫瘍抗原タンパク質に対する抗体の存在を検出する方法などがあげられる。検出方法としては、免疫組織化学法、イムノブロット法、放射免疫測定法(RIA)、酵素免疫測定法(ELISA)、蛍光あるいは発光測定法等より適宜選択できる。また、抗体を用いて腫瘍抗原タンパク質を検出することにより、腫瘍の早期発見、再発見が可能となり、また腫瘍抗原タンパク質、腫瘍抗原ペプチドまたはそれらをコードするDNAを用いた医薬の適応可能な腫瘍患者の選択が可能になる。

### 図面の簡単な説明

図1は、実施例2のノーザンブロットハイブリダイゼーションの結果を示す電気泳動の写真である。

図1のa)中KE-4、KE-3、TE-8およびTE-9は食道癌細胞株を、Kuma-1は頭頸部癌細胞株を、HSC-4は口腔癌細胞株を、Bec-1はB細胞株を、KMG-Aは胆嚢癌細胞株を、R-27は乳癌細胞株を、KIM-1、KYN-1およびHAK-3は肝癌細胞株を、そしてM36およびM37はメラノーマ細胞株を、それぞれ表す。

### 実施例

以下、本発明の一例として実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

### 参考例1

#### 食道癌細胞株に対する細胞傷害性T細胞（CTL）株の樹立

中尾ら著，Cancer Res.，55:4248-4252(1995)の記載に従い、組織型が扁平上皮癌に分類される食道癌細胞株KE-4に対するCTLを患者の末梢血単核球細胞から樹立し、KE-4CTLと命名して実験に使用した。食道癌細胞株KE-4およびKE-4CTLは、茨城県つくば市東1丁目1番3号、工業技術院生命工学工業技術研究所に、それぞれ受託番号FERM BP-5955およびFERM BP-5954で寄託されている（寄託日：いずれも平成9年5月23日）。また、前述の中尾らの報告に従い、KE-4のHLAクラスI分子のタイピングを行い、HLA-A2402、-A2601、-B54、-B60、-Cw1、-Cw3であることを確認した。

### 参考例2

#### HLA-A2601 cDNA及びHLA-A2402 cDNAの調製

KE-4から、中尾ら著，Cancer Res.，55:4248-4252(1995)の記載に従い、HLA-A2601のcDNAを発現ベクターpCR3(INVITROGEN社製)に組み込んだ



組換えプラスミドを作製した。また同様な方法により、HLA-A2402についても組換えプラスミドを作製した。

### 参考例 3

#### KE-4由来 cDNA ライブラリーの作製

KE-4から mRNA 精製システム (ファルマシアバイオテック社製) を用い添付のプロトコールに従い、全 RNA 画分の分離および oligo(dT) カラムによる poly(A)<sup>+</sup> mRNA の調製を行った。mRNA よりスーパースクリプトプラスミドシステム (GIBCO BRL 社製) を用い添付のプロトコールに従い、両端に NotI アダプターと SalI アダプターを連結した cDNA を作製した後、この cDNA を発現ベクターのプラスミド pSV-SPORT1 (GIBCO BRL 社製) の制限酵素 NotI および SalI の切断部位にライゲーションにより連結して組換えプラスミドを得た。この組換えプラスミドをジーンパルサー (Bio-Rad 社製) を用いて 25  $\mu$ F, 2.5k V の条件で、電気パルスにより大腸菌のエレクトロマックス DH10B/p3<sup>TM</sup> セル (GIBCO BRL 社製) に導入し、アンピシリン (50  $\mu$ g/ml) を含む LB 培地 (1% バクトトリプトン、0.5% イーストエキス、0.5% NaCl、pH7.3) で組換えプラスミドが導入されている形質転換体を選択した。

### 参考例 4

#### インターフェロン- $\gamma$ の定量

インターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) の定量は、エンザイムイムノアッセイ (ELISA) により行った。96 ウェルマイクロプレートに固着化抗体として抗ヒト IFN- $\gamma$  マウスモノクローナル抗体を吸着させ、ウシ血清アルブミンで非特異的結合をブロックした後、検体中の IFN- $\gamma$  を抗体に結合させた。次に検出抗体として抗ヒト IFN- $\gamma$  ウサギポリクローナル抗体を結合させ、さらにアルカリフォスファターゼ標識した抗ウサギイムノグロブリンヤギ抗体

を結合した後、発色基質としてパラニトロフェニルフォスフェートを反応させ、1N NaOHを等量加えて反応を停止させた後、吸光度(405nm)を測定した。これをスタンダードのIFN- $\gamma$ で得られた値と比較することにより定量した。

### 実施例 1

#### 新規な腫瘍抗原タンパク質遺伝子のスクリーニング

参考例 3 に示した形質転換体の約100個のプールからの組換えプラスミドDNAの回収は以下のように行った。すなわち、アンピシリン (50  $\mu$ g/ml)を含むLB培地の入った96ウェルU底マイクロプレートにウェルあたり100個の形質転換体を加え培養後、その一部をウェル当たり0.25mlのTYGPN培地(F. M. Ausubelら編、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Inc.)の入った別の96ウェルU底マイクロプレートに移して37°Cで48時間培養し、残りのLB培地のマイクロプレートは凍結保存した。TYGPN培地で培養した形質転換体の組換えプラスミドDNAは、マイクロプレートでアルカリ溶解法(F. M. Ausubelら編、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Inc.)により調製した。イソプロパノール沈澱で回収した組換えプラスミドDNAは、50  $\mu$ lの20ng/ml RNaseを含む10mM Tris, 1mM EDTA, pH7.4溶液で懸濁した。

線維芽細胞株のVA-13 細胞(理化学研究所細胞開発銀行、Ann. Med. Exp. Biol. Fenn., 44:242-254, 1966)へ、リポフェクチン法により以下のようにKE-4 cDNAの組換えプラスミドとBLA-A2601 cDNAの組換えプラスミドをダブルトランスフェクトした。すなわち、VA-13細胞を96ウェル平底マイクロプレートにウェルあたり7000個を加えて、100  $\mu$ lの10% FCSを含むRPMI 1640培養液で2日間培養した。リポフェクチン試薬(GIBCO BRL社製)を用い、形質転換体約 100個分のKE-4 cDNAの組換えプラスミド2

5 $\mu$ lと参考例2に示したHLA-A2601 cDNAの組換えプラスミド10 $\mu$ l(200ng)と約35倍に希釈したリポフェクチン試薬35 $\mu$ lの混合液70 $\mu$ lの30 $\mu$ lをVA-13細胞に加えてダブルトランスフェクトした。トランスフェクタントは2点ずつ用意した。5時間後、このトランスフェクタントに200 $\mu$ lの10% FCSを含む培養液を加え、更に72時間、37℃で培養した後、培養液を除去し、ウェル当たり10000個のKE-4CTLを加えて100 $\mu$ lの10%FCSと25U/mlのIL-2を含む培養液で37℃で24時間培養した。培養液を回収し、IFN- $\gamma$ をELISAで測定した。

高いIFN- $\gamma$ 産生が認められた4群については、該当する凍結保存してあったKE-4 cDNAの組み換えプラスミドによる形質転換体約100個のプールを用いてさらに以下のようにスクリーニングを行った。すなわち、形質転換体のプールをアンピシリン(50 $\mu$ g/ml)を含むLB寒天培地のプレートにまいてコロニーを得て、各群200コロニー、合計800コロニーについてウェル当たりの形質転換体が1種類となる条件で上記と同様の方法で培養し、KE-4 cDNAの組換えプラスミドDNAを調製した。さらに上記と同様な方法でVA-13細胞へのKE-4 cDNAの組換えプラスミドとHLA-A2601 cDNAの組換えプラスミドのダブルトランスフェクトを行い、引き続いてKE-4CTLとの混合培養を行い、KE-4CTLが反応して産生した培養液中のIFN- $\gamma$ の定量を行って陽性のプラスミドを選択した。この操作によりKE-4 cDNA組換えプラスミドクローンが選択され、6DIと命名した。6DIについては、さらにもう一度、同様な操作を繰り返してKE-4CTL細胞によるIFN- $\gamma$ の産生量を参考例4の方法により定量した。その結果を以下の表1に示す。

表 1

標的細胞	KE-4CTLが産生したIFN- $\gamma$ 量 (pg/ml)
VA-13細胞	0
VA-13細胞+HLA-A2601	1. 8
VA-13細胞+6DI	4. 3
VA-13細胞+HLA-A2601 +6DI	24. 0
VA-13細胞+HLA-A0201 <sup>1)</sup>	0. 9
VA-13細胞+HLA-A0201+6DI <sup>1)</sup>	3. 0

1): 比較のため異なったタイプのHLAをトランスフェクトした場合  
(トランスフェクトしたDNA量、HLA-A2601、HLA-A0201が200ng、6DIが100ngの時のデータ)

## 実施例 2

### ノーザンハイブリダイゼーションによる腫瘍抗原タンパク質遺伝子発現の解析

種々の細胞株より、RNAzol B(TEL-TEST, INC. 社製)を用いてRNAを調製した。5  $\mu$ gのRNAをホルムアミド、ホルムアルデヒド存在下で変性させ、アガロース電気泳動を行った後、Hybond-N+ ナイロンメンブレン(Amersham社製)に転写、固定した。正常組織のRNAについては、mRNAを固定した市販のメンブレン(CLONTECH 社製)を用いた。マルチプライムDNAラベリングシステム(Amersham 社製)により、実施例1でクローニングした組換えプラスミド6DIの挿入配列部分を<sup>32</sup>Pで標識してDNAプローブを作製し、公知の方法(中山ら著、バイオ実験イラストレイテッド②遺伝子解析の基礎、p.148-151、秀潤社、1995年)に従って、メンブレン上のRNAにハイブリダイズさせた後、オートラジオグラフィーにより、

本発明の腫瘍抗原タンパク質遺伝子のmRNAを検出した。次に、該遺伝子のmRNAの検出に用いたメンブレンを、0.5%ドデシル硫酸ナトリウム水溶液中で煮沸してプローブを剥がした後、細胞で恒常的に発現している $\beta$ -アクチンをプローブとして、同様の方法でノーザンハイブリダイゼーションを行い、mRNAを検出して内部標準とした。結果を図1に示す。これらの結果より、本発明の腫瘍抗原タンパク質遺伝子のmRNAは、各種癌細胞及び正常組織で広範に発現しており、全長は、約2.5kbであることが明らかになった(図1)。

### 実施例3

#### 腫瘍抗原タンパク質をコードする全長のcDNAクローンのクローニングと塩基配列の決定

参考例3に示したKE-4由来cDNAライブラリーをアンピシリン(50 $\mu$ g/ml)を含むLB寒天培地のプレートにまいてコロニーを得た後、Hybond-N+ ナイロンメンブレン(Amersham社製)に添付のプロトコールに従って、コロニーのDNAを転写、固定した。実施例2で使用したのと同じ6DIプローブを用い、実施例2と同様の条件でハイブリダイゼーションとオートラジオグラフィーを行って、腫瘍抗原タンパク質遺伝子のcDNAが組み込まれた組換えプラスミドを有する形質転換体のコロニーを選択した。さらに、選択された複数のコロニーより組換えプラスミドを回収し、制限酵素NotI及びSalIで処理した後、アガロース電気泳動により組み込まれたcDNAの長さを確認した。約2.5kbのcDNAが組み込まれた組換えプラスミドを選択し、これをK3と命名した。このプラスミドK3についてDyeDeoxy Terminator Cycle Sequencingキット(パーキンエルマー社製)を使用して、cDNA部分の塩基配列を決定した。決定された塩基配列を、配列表の配列番号:2に示す。該cDNAの全長は252

7塩基対であった。配列番号：2の塩基配列によってコードされるアミノ酸配列（800アミノ酸）を、配列番号：1に示す。

解析の結果、配列番号：2の塩基配列は、メラノーマ由来の既知の腫瘍抗原タンパク質の遺伝子とは相同性はなく、異なる遺伝子であった。WWW Entrezデータベースを使用し、配列番号：2に記載した塩基配列の検索を行った結果、本発明の塩基配列の一部が、WashU-Merck EST Projectにより解読され、GENBANK に登録されている機能不明の3種類の遺伝子配列、Accession No. R89163、R62890、R00027と90%以上の高い相同性を示すことが明らかになった。No. R89163は配列1893～2267番、R62890は配列2018～2389番、R00027は配列2024～2510番に相当する。しかし、これらの配列は本発明の塩基配列の開始コドンより3'側の塩基配列であることから、アミノ酸配列を決定することができない。

なお、上記の塩基配列決定後、プラスミドK3をE. coli JM109に導入し、本発明の新規な腫瘍抗原タンパク質cDNAを含有する保存用の形質転換体であるE. coli JM109(K3)を調製した。E. coli JM109(K3)は、茨城県つくば市東1丁目1番3号、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている（寄託日：平成9年5月22日；寄託番号：FERMBP-5951）。

さらに、正常ヒト組織（末梢血リンパ球）のcDNAライブラリー（GIBCO BRL社製）を前記と同様にスクリーニングしたところ、約2.5kbのcDNAが組み込まれた組換えプラスミドがクローニングされ、該cDNAの塩基配列を決定したところ、配列番号：2の塩基配列の第812位（正常ヒト組織での第812位は“T”である）が異なる以外は同一であるcDNAが単離された。従って、本発明の腫瘍抗原タンパク質をコードする遺伝子を含む全長の遺伝子は、癌細胞と正常ヒト組織で、ほぼ同一の

遺伝子が発現していることが示唆された。

次に、実施例 1 と同様な方法で、新規な腫瘍抗原タンパク質遺伝子の cDNA が組み込まれた組換えプラスミド K3 と、HLA-A2601 の cDNA が組み込まれた組換えプラスミドとを VA-13 細胞にダブルトランスフェクトした細胞を標的細胞として、KE-4CTL が反応して産生した IFN- $\gamma$  量を、参考例 4 の方法により定量した。その結果を以下の表 2 に示す。

表 2

標的細胞	KE-4CTL が産生した IFN- $\gamma$ 量 <sup>1)</sup> (pg/ml)
VA-13 細胞 + HLA-A2601 + K3	1 4 3 9
VA-13 細胞 + HLA-A0201 <sup>2)</sup> + K3	1 0

1) : VA-13 細胞にそれぞれの HLA をトランスフェクトした細胞に対する KE-4 CTL が産生した IFN- $\gamma$  量 (バックグラウンド) を差し引いた値

2) : 比較のため異なったタイプの HLA をトランスフェクトした場合

(トランスフェクトした DNA 量 : HLA-A2601、HLA-A0201 が 200ng、K3 が 100ng の時のデータ)

#### 実施例 4

##### 腫瘍抗原ペプチドの同定

実施例 1 でクローニングした新規な腫瘍抗原タンパク質遺伝子の部分 cDNA が組み込まれた組換えプラスミド 6DI より、Kilo-Sequence 用 Deletion Kit (宝酒造社製) を用いて、添付のプロトコールに従って、腫瘍抗原タンパク質遺伝子の cDNA が様々な長さにデリーションされたプラスミドを得た。これらのプラスミドを大腸菌のエレクトロマックス DH10B/p3<sup>TM</sup> セル (GIBCO BRL 社) に導入し、寒天培地のプレート上で培養し、

無作為に50個のコロニーを選択した。該コロニーよりプラスミドDNAを調製し、電気泳動に付すことにより、適当な長さのプラスミドを有する5個のクローンを選択した。

実施例1に記載の方法により、VA-13細胞へHLA-A2601 cDNAと前記プラスミドDNAをダブルトランスフェクトし、引き続いて、該トランスフェクタントとKE-4CTLとを混合培養し、参考例4に記載の方法に従って、培養液中のIFN- $\gamma$ を定量した。この結果、配列番号：2の塩基配列の2253番目以降が欠失したプラスミドのトランスフェクタントには、KE-4CTLからのIFN- $\gamma$ 誘導活性が認められなかった。従って、配列番号：1のアミノ酸配列の739番目の近傍以降の配列を有するペプチドにKE-4CTLからのIFN- $\gamma$ 誘導活性があると予想された。

次に、配列番号：1のアミノ酸配列の730番目以降を3アミノ酸ずつずらして10アミノ酸残基のペプチドを21種類合成した。これらのペプチドを、HLA-A2601 cDNAをトランスフェクトしたVA-13細胞にパルスして抗原提示させたこと以外は前記と同様な方法で、培養液中のIFN- $\gamma$ を定量した。この結果、配列番号：1の「736～745」、「748～757」、「784～793」のアミノ酸配列を有するペプチドにIFN- $\gamma$ 誘導活性が認められた。

さらに、これら3種類のペプチドについて、より強いIFN- $\gamma$ 誘導活性を有するペプチドを同定するために、N末端またはC末端を1アミノ酸短くした9アミノ酸残基のペプチドを合成し、同様にIFN- $\gamma$ 誘導活性を測定したところ、配列番号：1の「736～744」、「749～757」、「785～793」のアミノ酸配列を有するペプチドにより強いIFN- $\gamma$ 誘導活性が認められた。その結果を表3に示す。



表 3

パルスした細胞	ペプチド	KE4-CTL細胞が産生したIFN- $\gamma$ 量(pg/ml)
VA-13/A2601 <sup>1)</sup>	「736~744」	203
VA-13/A0201 <sup>2)</sup>	「736~744」	44
VA-13/A2601	「749~757」	183
VA-13/A0201	「749~757」	89
VA-13/A2601	「785~793」	394
VA-13/A0201	「785~793」	102

1)VA-13細胞にHLA-A2601 cDNAをトランスフェクトした場合

2)対照としてVA-13細胞に異なったHLA-A0201 cDNAをトランスフェクトした場合

表3より、これらのペプチドが腫瘍抗原ペプチドとして機能することが示唆された。

また、HLA分子に結合して提示される抗原ペプチドの配列には規則性(モチーフ)のあることが知られており、HLA-A24の場合、9アミノ酸残基よりなる抗原ペプチドのうち、2番目がチロシン、9番目がイソロイシン、ロイシン又はフェニルアラニンがモチーフとなることが知られている(Immunogenetics, 41:178-228, 1995)。

そこで配列番号: 1に記載のアミノ酸配列より、上記モチーフに相当する「690~698」のアミノ酸配列を有するペプチドを合成した。そして、HLA-A2402 cDNAをトランスフェクトしたVA-13細胞にパルスし、前記と同様な方法で、KE-4CTLからのIFN- $\gamma$ 誘導活性を調べた。結果を表4に示す。

表 4

パルスした細胞	ペプチド	KE4-CTL細胞が産生したIFN- $\gamma$ 量(pg/ml)
VA-13	「690~698」	157
VA-13/A2402 <sup>1)</sup>	「690~698」	269
VA-13/A0201 <sup>2)</sup>	「690~698」	166

1)VA-13細胞にHLA-A2402 cDNAをトランスフェクトした場合

2)対照としてVA-13細胞に異なったHLA-A0201 cDNAをトランスフェクトした場合

表4より、「690~698」のペプチドが、腫瘍抗原ペプチドとして機能することが示唆された。

#### 実施例 5

##### 腫瘍抗原ペプチドによる末梢血リンパ球からのCTLの誘導

実施例3で示された腫瘍抗原ペプチドを用いて、KE-4の由来である癌患者の末梢血リンパ球をin vitroで刺激して抗原特異的なCTLが誘導できるか検討した。使用した腫瘍抗原ペプチドは、前記実施例3で得られた「736~744」、「749~757」、「690~698」の配列を有するペプチドである。前記癌患者由来の末梢血からフィコール法によりリンパ球を分離して凍結保存していた末梢血リンパ球を起眠させ、24穴のプレートに約 $2 \times 10^5$ 細胞/穴となるように移し、10%FCSとIL-2(100U/ml)を含むRPMI 1640培地で培養した。培養液に前記腫瘍抗原ペプチドを $10 \mu\text{g/ml}$ になるように加え、末梢血リンパ球を刺激した。1週間後、X線照射(50Gy)した約 $1 \times 10^5$ 個の末梢血リンパ球とともに前記腫瘍抗原ペプチドを $10 \mu\text{g/ml}$ 加えて、2回目の刺激を行った。さらに1週間後、3回目の刺激を同様に繰り返した。

「736～744」、「749～757」の配列を有するペプチドについては3回目の刺激から1週間後、末梢血リンパ球を回収し、D. D. Kharkevitchら著、Int. J. Cancer, 58:317(1994)に記載の方法に従って、 $^{51}\text{Cr}$ で標識されたKE-4、及びHLA-AローカスA2402及びA2である食道癌細胞株KE-3を標的細胞として、細胞傷害活性を測定した。結果を表5に示す。

表5

効果細胞	標的細胞	傷害活性 (%)
「736～744」で刺激した 末梢血リンパ球	KE-4	22.1
	KE-3	3.7
「749～757」で刺激した 末梢血リンパ球	KE-4	35.9
	KE-3	24.2

「736～744」の配列を有するペプチドで刺激した場合は、KE-4は強く傷害されたが、陰性対照のKE-3は傷害されなかったことから、KE-4特異的なCTLが誘導されていることが示された。また、「749～757」の配列を有するペプチドで刺激した場合は、KE-3に対する非特異的な細胞傷害活性が認められたが、KE-4に対してより強い細胞傷害活性が認められたことから、KE-4特異的なCTLが誘導されていることが示唆された。

「690～698」の配列を有するペプチドについては、3回目の刺激の後、末梢血リンパ球を回収し、10% FCS、50% AIM-V (GIBCO BRL社製)、IL-2 (100U/ml) を含むRPMI-1640培地で培養を続けた。その後、前記と同様の方法にて、 $^{51}\text{Cr}$ で標識されたKE-4、及びVA-13細胞を標的細胞として細胞傷害活性を測定した。また、HLA-AローカスA24のホモである健常人の末梢血からリンパ球を分離し、同様の方法にて $^{51}\text{Cr}$ で標識されたKE-4、

及びHLA-AローカスがA2601のホモである肺癌細胞株のQG-56細胞を標的細胞として、細胞傷害活性を測定した。結果を表6に示す。

表6

効果細胞	標的細胞	傷害活性 (%)
「690~698」で刺激した	KE-4	24.7
癌患者末梢血リンパ球	VA-13	13.8
「690~698」で刺激した	KE-4	17.7
健常人末梢血リンパ球	QG-56	11.5

癌患者末梢血リンパ球及び健常人末梢血リンパ球を「690~698」の配列を有するペプチドで刺激することにより、陰性対照であるVA13細胞、QG56細胞に対する非特異的な細胞傷害活性が認められたが、KE-4に対してより強い細胞傷害活性が認められた。以上の結果から、KE-4特異的なCTLが誘導されていることが示唆された。

#### 発明の効果

本発明により腫瘍抗原タンパク質および腫瘍抗原ペプチドを用いた抗腫瘍免疫を活性化するための医薬、自己免疫疾患を治療するための医薬、および腫瘍抗原タンパク質をコードするDNA等を含有する医薬を提供することができ、また腫瘍または自己免疫疾患の診断方法を提供することができる。

## 配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 800

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

## 起源

生物名 : ヒト (Homo sapiens)

組織の種類 : 食道癌組織

## 配列の特徴

特徴を表す記号 : peptide

存在位置 : 1..800

特徴を決定した方法 : P

## 配列

Met	Gly	Ser	Ser	Lys	Lys	His	Arg	Gly	Glu	Lys	Glu	Ala	Ala	Gly	Thr
				5					10					15	
Thr	Ala	Ala	Ala	Gly	Thr	Gly	Gly	Ala	Thr	Glu	Gln	Pro	Pro	Arg	His
				20				25						30	
Arg	Glu	His	Lys	Lys	His	Lys	His	Arg	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser
				35				40						45	
Gly	Gly	Glu	Arg	Arg	Lys	Arg	Ser	Arg	Glu	Arg	Gly	Gly	Glu	Arg	Gly
				50				55					60		
Ser	Gly	Arg	Arg	Gly	Ala	Glu	Ala	Glu	Ala	Arg	Ser	Ser	Thr	His	Gly
				65				70					75		80
Arg	Glu	Arg	Ser	Gln	Ala	Glu	Pro	Ser	Glu	Arg	Arg	Val	Lys	Arg	Glu

	85		90		95
Lys Arg Asp Asp Gly Tyr Glu Ala Ala Ala Ser Ser Lys Thr Ser Ser					
	100		105		110
Gly Asp Ala Ser Ser Leu Ser Ile Glu Glu Thr Asn Lys Leu Arg Ala					
	115		120		125
Lys Leu Gly Leu Lys Pro Leu Glu Val Asn Ala Ile Lys Lys Glu Ala					
	130		135		140
Gly Thr Lys Glu Glu Pro Val Thr Ala Asp Val Ile Asn Pro Met Ala					
	145		150		155
Leu Arg Gln Arg Glu Glu Leu Arg Glu Lys Leu Ala Ala Ala Lys Glu					
	165		170		175
Lys Arg Leu Leu Asn Gln Lys Leu Gly Lys Ile Lys Thr Leu Gly Glu					
	180		185		190
Asp Asp Pro Trp Leu Asp Asp Thr Ala Ala Trp Ile Glu Arg Ser Arg					
	195		200		205
Gln Leu Gln Lys Glu Lys Asp Leu Ala Glu Lys Arg Ala Lys Leu Leu					
	210		215		220
Glu Glu Met Asp Gln Glu Phe Gly Val Ser Thr Leu Val Glu Glu Glu					
	225		230		235
Phe Gly Gln Arg Arg Gln Asp Leu Tyr Ser Ala Arg Asp Leu Gln Gly					
	245		250		255
Leu Thr Val Glu His Ala Ile Asp Ser Phe Arg Glu Gly Glu Thr Met					
	260		265		270
Ile Leu Thr Leu Lys Asp Lys Gly Val Leu Gln Glu Glu Glu Asp Val					
	275		280		285

Leu Val Asn Val Asn Leu Val Asp Lys Glu Arg Ala Glu Lys Asn Val  
 290 295 300  
 Glu Leu Arg Lys Lys Lys Pro Asp Tyr Leu Pro Tyr Ala Glu Asp Glu  
 305 310 315 320  
 Ser Val Asp Asp Leu Ala Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ile Leu Ser Lys  
 325 330 335  
 Tyr Asp Glu Glu Leu Glu Gly Glu Arg Pro His Ser Phe Arg Leu Glu  
 340 345 350  
 Gln Gly Gly Thr Ala Asp Gly Leu Arg Glu Arg Glu Leu Glu Glu Ile  
 355 360 365  
 Arg Ala Lys Leu Arg Leu Gln Ala Gln Ser Leu Ser Thr Val Gly Pro  
 370 375 380  
 Arg Leu Ala Ser Glu Tyr Leu Thr Pro Glu Glu Met Val Thr Phe Lys  
 385 390 395 400  
 Lys Thr Lys Arg Arg Val Lys Lys Ile Arg Lys Lys Glu Lys Glu Val  
 405 410 415  
 Val Val Arg Ala Asp Asp Leu Leu Pro Leu Gly Asp Gln Thr Gln Asp  
 420 425 430  
 Gly Asp Phe Gly Ser Arg Leu Arg Gly Arg Gly Arg Arg Val Ser  
 435 440 445  
 Glu Val Glu Glu Glu Lys Glu Pro Val Pro Gln Pro Leu Pro Ser Asp  
 450 455 460  
 Asp Thr Arg Val Glu Asn Met Asp Ile Ser Asp Glu Glu Glu Gly Gly  
 465 470 475 480  
 Ala Pro Pro Pro Gly Ser Pro Gln Val Leu Glu Glu Asp Glu Ala Glu

485	490	495
Leu Glu Leu Gln Lys Gln Leu Glu Lys Gly Arg Arg Leu Arg Gln Leu		
500	505	510
Gln Gln Leu Gln Gln Leu Arg Asp Ser Gly Glu Lys Val Val Glu Ile		
515	520	525
Val Lys Lys Leu Glu Ser Arg Gln Arg Gly Trp Glu Glu Asp Glu Asp		
530	535	540
Pro Glu Arg Lys Gly Ala Ile Val Phe Asn Ala Thr Ser Glu Phe Cys		
545	550	555
Arg Thr Leu Gly Glu Ile Pro Thr Tyr Gly Leu Ala Gly Asn Arg Glu		
565	570	575
Glu Gln Glu Glu Leu Met Asp Phe Glu Arg Asp Glu Glu Arg Ser Ala		
580	585	590
Asn Gly Gly Ser Glu Ser Asp Gly Glu Glu Asn Ile Gly Trp Ser Thr		
595	600	605
Val Asn Leu Asp Glu Glu Lys Gln Gln Gln Asp Phe Ser Ala Ser Ser		
610	615	620
Thr Thr Ile Leu Asp Glu Glu Pro Ile Val Asn Arg Gly Leu Ala Ala		
625	630	635
Ala Leu Leu Leu Cys Gln Asn Lys Gly Leu Leu Glu Thr Thr Val Gln		
645	650	655
Lys Val Ala Arg Val Lys Ala Pro Asn Lys Ser Leu Pro Ser Ala Val		
660	665	670
Tyr Cys Ile Glu Asp Lys Met Ala Ile Asp Asp Lys Tyr Ser Arg Arg		
675	680	685



Glu Glu Tyr Arg Gly Phe Thr Gln Asp Phe Lys Glu Lys Asp Gly Tyr  
 690 695 700  
 Lys Pro Asp Val Lys Ile Glu Tyr Val Asp Glu Thr Gly Arg Lys Leu  
 705 710 715 720  
 Thr Pro Lys Glu Ala Phe Arg Gln Leu Ser His Arg Phe His Gly Lys  
 725 730 735  
 Gly Ser Gly Lys Met Lys Thr Glu Arg Arg Met Lys Lys Leu Asp Glu  
 740 745 750  
 Glu Ala Leu Leu Lys Lys Met Ser Ser Ser Asp Thr Pro Leu Gly Thr  
 755 760 765  
 Val Ala Leu Leu Gln Glu Lys Gln Lys Ala Gln Lys Thr Pro Tyr Ile  
 770 775 780  
 Val Leu Ser Gly Ser Gly Lys Ser Met Asn Ala Asn Thr Ile Thr Lys  
 785 790 795 800

配列番号 : 2

配列の長さ : 2527

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

ハイボセティカル配列 : No

アンチセンス : No

起源

生物名 : ヒト (Homo sapiens)

組織の種類：食道癌組織

配列の特徴

特徴を表す記号：5' UTR

存在位置：1..38

特徴を決定した方法：E

特徴を表す記号：CDS

存在位置：39..2438

特徴を決定した方法：E

特徴を表す記号：3' UTR

存在位置：2439..2506

特徴を決定した方法：E

特徴を表す記号：polyA site

存在位置：2507..2527

特徴を決定した方法：E

配列

```
GGTTCGGCGG CAGCCGGGCT CGGAGTGGAC GTGCCACTAT GGGGTCGTCC AAGAAGCATC 60
GCGGAGAGAA GGAGGCGGCC GGGACGACGG CGCGGCCCGG CACCGGGGGT GCCACCGAGC 120
AGCGCCCGCG GCACCGGGA CACAAAAAAC ACAAGCACCG GAGTGGCGGC AGTGGCGGTA 180
GCGGTGGCGA ACGACGGAAG CGGAGCCGGG AACGTGGGGG CGAGCGCGGG AGCGGGCGGC 240
GCGGGGCCGA AGCTGAGGCC CGGAGCAGCA CGCACGGGCG GGAGCGCAGC CAGGCAGAGC 300
OCTCCGAGCG GCGCGTGAAG CGGGAGAAGC GCGATGACGG CTACGAGGCC GCTGCCAGCT 360
CCAAACTAG CTCAGCGGAT GCCTCCTCAC TCAGCATCGA GGAGACTAAC AAACCTCCGGG 420
```

CAAAGTTGGG GCTGAAACCC TTGGAGGTTA ATGCCATCAA GAAGGAGGCG GGCACCAAGG 480  
AGGAGCCCGT GACAGCTGAT GTCATCAACC CTATGGCCTT GCGACAGCGA GAGGAGCTGC 540  
GGGAGAAGCT GGCGGCTGCC AAGGAGAAGC GCCTGCTGAA CCAAAAGCTG GGGAAAGATAA 600  
AGACCCTAGG AGAGGATGAC CCCTGGCTGG ACGACACTGC AGCCTGGATC GAGAGGAGCC 660  
GGCAGCTGCA GAAGGAGAAG GACCTGGCAG AGAAGAGGGC CAAGTTACTG GAGGAGATGG 720  
ACCAAGAGTT TGGTGTGAGC ACTCTGGTGG AGGAGGAGTT CGGGCAGAGG CGGCAGGACC 780  
TGTACAGTGC CCGGGACCTG CAGGGCCTCA CCGTGGAGCA TGCCATTGAT TCCTTCCGAG 840  
AAGGGGAGAC AATGATTCTT ACCCTCAAGG ACAAAGGCGT GCTGCAGGAG GAGGAGGACG 900  
TGCTGGTGAA CGTGAACCTG GTGGATAAGG AGCGGGCAGA GAAAAATGTG GAGCTGCCGA 960  
AGAAGAAGCC TGA CTACCTG CCCTATGCCG AGGACGAGAG CGTGGACGAC CTGGCGCAGC 1020  
AAAAACCTCG CTCTATCTG TCCAAGTATG ACGAAGAGCT TGAAGGGGAG CGGCCACATT 1080  
CCTTCCGCTT GGAGCAGGGC GGCACGGCTG ATGGCCTGCG GGAGCGGGAG CTGGAGGAGA 1140  
TCCGGGCCAA GCTGCGGCTG CAGGCTCAGT CCCTGAGCAC AGTGGGGCCC CGGCTGGCCT 1200  
CCGAATACCT CACGCCTGAG GAGATGGTGA CCTTTAAAAA GACCAAGCGG AGGGTGAAGA 1260  
AAATCCGCAA GAAGGAGAAG GAGGTAGTAG TGCGGGCAGA TGA CTGCTG CTCTCGGGG 1320  
ACCAGACTCA GGATGGGGAC TTTGGTTCCA GACTGCGGGG ACGGGGTGCG CGCCGAGTGT 1380  
CCGAAGTGGA GGAGGAGAAG GAGCCTGTGC CTCAGCCCCCT GCCGTGGAC GACACCCGAG 1440  
TGGAGAACAT GGACATCAGT GATGAGGAGG AAGGTGGAGC TCCACCGCCG GGGTCCCCGC 1500  
AGGTGCTGGA GGAGGACGAG GCGGAGCTGG AGCTGCAGAA GCAGCTGGAG AAGGGACGCC 1560  
GGCTGCGACA GTTACAGCAG CTACAGCAGC TGCGAGACAG TGGCGAGAAG GTGGTGGAGA 1620  
TTGTGAAGAA GCTGGAGTCT CGCCAGCGGG GCTGGGAGGA GGATGAGGAT CCCGAGCGGA 1680  
AGGGGGCCAT CGTGTTC AAC GCCAOGTCCG AGTTCTGCCG CACCTTGGGG GAGATCCCCA 1740  
CCTACGGGCT GGCTGGCAAT CGCGAGGAGC AGGAGGAGCT CATGGACTTT GAACGGGATG 1800  
AGGAGCGCTC AGCCAACGGT GGCTCCGAAT CTGACGGGGA GGAGAACATC GGCTGGAGCA 1860  
CGGTGAACCT GGACGAGGAG AAGCAGCAGC AGGATTCTC TGCTTCTCC ACCACCATCC 1920

TGGACGAGGA ACCGATCGTG AATAGGGGGC TGGCAGCTGC CCTGCTCCTG TGTCAGAACA 1980  
AAGGGCTGCT GGAGACCACA GTGCAGAAGG TGGCCCCGGT GAAGGCCCCC AACAAAGTCGC 2040  
TGCCCTCAGC CGTGTACTGC ATCGAGGATA AGATGGCCAT CGATGACAAG TACAGCCGGA 2100  
GGGAGGAATA CCGAGGCTTC ACACAGGACT TCAAGGAGAA GGACGGCTAC AAACCCGACG 2160  
TTAAGATCGA ATACGTGGAT GAGACGGGCC GGAAACTCAC ACCCAAGGAG GCTTTCCGGC 2220  
AGCTGTCGCA CCGCTTCCAT GGCAAGGGCT CAGGCAAGAT GAAGACAGAG CGGCGGATGA 2280  
AGAAGCTGGA CGAGGAGGCG CTCCTGAAGA AGATGAGCTC CAGCGACACG CCCCTGGGCA 2340  
CCGTGGCCCT GCTCCAGGAG AAGCAGAAGG CTCAGAAGAC CCCCTACATC GTGCTCAGCG 2400  
GCAGCGGCAA GAGCATGAAC GCGAACACCA TCACCAAGTG ACAGCGCCCT CCCGTAGTCG 2460  
GCCCTGCCTC AACCTTCATA TTAAATAAAG CTCCTCCTT ATTTTAAAA AAAAAAAAAA 2520  
AAAAAAA 2527

## 請 求 の 範 囲

1. 配列番号：1のアミノ酸配列を有するタンパク質、又はそのアミノ酸配列のうち1もしくは複数のアミノ酸残基が置換、欠失もしくは付加された変異タンパク質、をコードするDNA（ただし、該タンパク質および変異タンパク質はその細胞内分解により、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスI抗原と結合し得るペプチド断片であってその結合状態でT細胞により認識され得るペプチド断片、を生じ得るものである）。

2. 配列番号：2の塩基配列からなるDNA、又はそのDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA変異体（ただし、該DNAおよびDNA変異体が発現して生産されるタンパク質は、その細胞内分解により、MHCクラスI抗原と結合し得るペプチド断片であってその結合状態でT細胞により認識され得るペプチド断片、を生じ得るものである）。

3. 請求項1または2記載のDNAを有効成分として含有する医薬。

4. 請求項1または2記載のDNAを有する発現プラスミド。

5. 請求項4記載の発現プラスミドによって形質転換された形質転換体。

6. 請求項1または2記載のDNAを発現して生産される腫瘍抗原タンパク質。

7. 請求項6記載のタンパク質の一部からなるペプチドであって、MHCクラスI抗原と結合してT細胞により認識され得る腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体。

8. 配列番号：1のアミノ酸配列の第749位～第757位、第736位～第744位、第785位～第793位、又は第690位～第698位のアミノ酸配列の全部又は一部を有するペプチドである、請求項7記載の腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体。

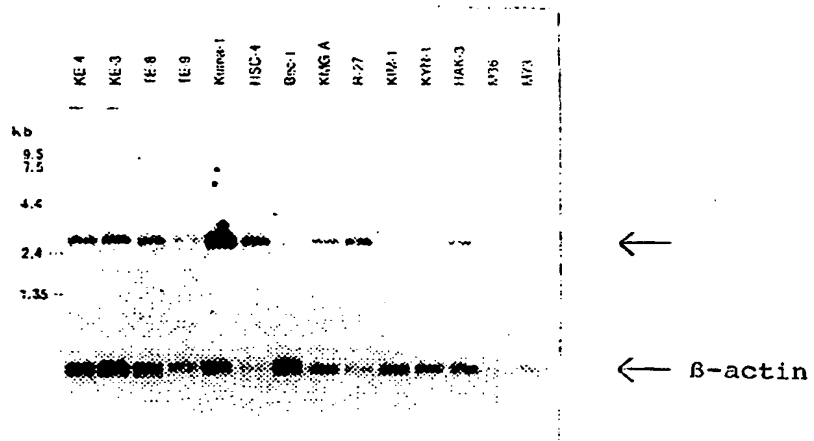
9. 請求項6記載の腫瘍抗原タンパク質、請求項7または8記載の腫瘍抗原ペプチド、または機能的に同等の特性を有するその誘導体を有効成分として含有する医薬。

10. 請求項6記載の腫瘍抗原タンパク質、または請求項7もしくは8記載の腫瘍抗原ペプチドに特異的に結合する抗体。

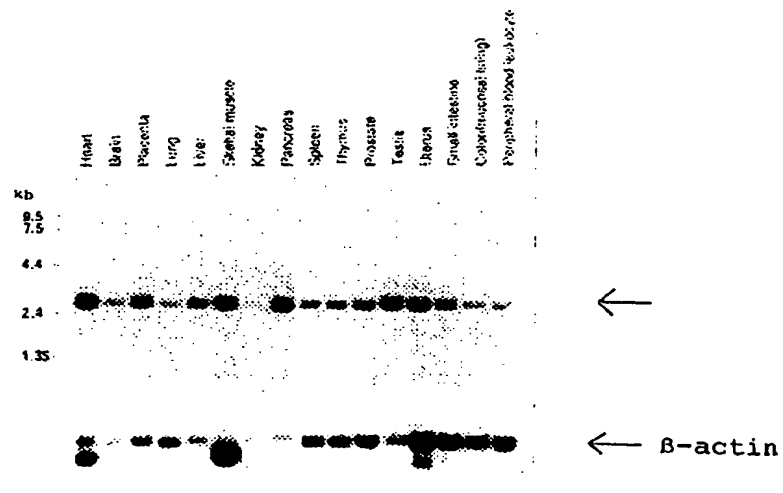
11. 配列番号：2の塩基配列からなるDNAのコーディング配列または5'ノンコーディング配列の中のDNA断片と相補的な配列をもつ8塩基以上からなるDNA若しくはそのDNAに対応するRNA、またはそれらの化学的修飾体。

Fig. 1

a)



b)



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/01893

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/12, A61K31/70, C12N5/10, C07K14/82, C07K16/32

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/12, A61K31/70, C12N5/10, C07K14/82, C07K16/32

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE, BIOSIS PREVIEWS, WPI, GENETYX-CD

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J. Exp. Med., Vol. 183, (1996), T. Boon et al.; "Human Tumor Antigens Recognized by T Lymphocytes", p. 725-729	1 - 11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

September 1, 1997 (01. 09. 97)

Date of mailing of the international search report

September 9, 1997 (09. 09. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.



## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP97/01893

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. <sup>8</sup> C12N15/12, A61K31/70, C12N5/10, C07K14/82, C07K16/32		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. <sup>8</sup> C12N15/12, A61K31/70, C12N5/10, C07K14/82, C07K16/32		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CAS ONLINE, BIOSIS PREVIEWS, WPI, GENETYX-CD		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J. Exp. Med., Vol. 183, (1996), T. Boon et al.; "Human Tumor Antigens Recognized by T Lymphocytes", p. 725-729	1-11
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 の日後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 01.09.97	国際調査報告の発送日 09.09.97	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 植野 浩志 印	4B 9452
電話番号 03-3581-1101 内線 3449		